



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 37 218 A 1**

⑦① Aktenzeichen: 199 37 218.7
⑦② Anmeldetag: 6. 8. 1999
⑦④ Offenlegungstag: 8. 2. 2001

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/435
C 07 K 1/22
C 07 K 1/18
C 12 N 9/14
C 12 Q 1/56

DE 199 37 218 A 1

⑦① Anmelder:
Aventis Behring GmbH, 35041 Marburg, DE

⑦② Erfinder:
Römis, Jürgen, Dr., 35041 Marburg, DE; Stöhr,
Hans-Arnold, 35083 Wetter, DE; Feußner, Annette,
35043 Marburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzym oder eines Gemisches beider Proteine mittels Affinitätschromatographie
- ⑤⑦ Es wird ein Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihres Proenzym durch Anwendung eines oder mehrerer affinitätschromatographischer Trennverfahren und/oder einer fraktionierten Fällung beschrieben, bei dem man als affinitätschromatographisches Trennverfahren die Adsorption an
- Kalziumphosphat/Hydroxylapatit,
 - einer hydrophoben Matrix,
 - einer Chelatmatrix,
 - einer Matrix, auf der Heparin oder eine mit Heparin verwandte Substanz wie Heparansulfat oder Dextransulfat immobilisiert ist und/oder
 - einer Matrix, die mit einem immobilisierten, gegen das zu isolierende Protein gerichteten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder seinen F(ab)- oder F(ab) 2-Fragmenten beschichtet ist, anwendet.
- Es werden außerdem eine pharmazeutische Zubereitung und ein Reagenz beschrieben, die die genannte Protease und ihr Proenzym enthalten.

DE 199 37 218 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzym oder eines Gemisches beider Proteine sowie von pharmazeutischen Zubereitungen, die genannten Proteine einzeln oder im Gemisch enthalten.

Aus der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 ist bereits eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung, zu ihrem Nachweis und zu ihrer Inaktivierung sowie Arzneizubereitungen bekannt, die diese Protease enthalten. Diese zuerst aus Plasma isolierte Protease kommt dort zusammen mit einer nicht-aktivierten Form vor, die im folgenden als "Proenzym" bezeichnet wird. Die Protease aktiviert den Blutgerinnungsfaktor VII und beschleunigt die Gerinnung, wie durch zahlreiche Experimente gezeigt werden konnte. Bei der weiteren Untersuchung der biologischen Eigenschaften dieses als Serin-Protease identifizierten Proteins stellte sich heraus, dass auch Einketten-Plasminogen-Aktivatoren wie die Prourokinase wirksam aktiviert werden. Außerdem wurde eine Inaktivierung der Faktoren V und VIII in vitro beobachtet. Zusätzlich zu den schon in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 beschriebenen sequenzierten Bereichen wurden N-terminale Sequenzierungen von Proteasefragmenten durchgeführt. Folgende Aminosäuresequenzen charakterisieren die FVII-aktivierende Protease: IYGGFK-STAGKHP; LLESLDPDXTDP; EFHEQSFRVEKI; SKFTXAXPXQFK; wobei X nicht identifiziert bedeutet. Die bisher aufgeklärten Sequenzen der genannten Protease zeigen, dass sie zu 100% mit Sequenzen der von Choi-Miura publizierten Protease übereinstimmen (Choi-Miura et al. J. Biochem. 1996; 119: 1157 bis 1165).

Die bisherigen Untersuchungen haben sich vor allem auf die Protease in ihrer aktivierten Form konzentriert. Die im Plasma als Proenzym vorliegende inaktive Form der Protease wurde erst vor kurzer Zeit anhand eines Protein-Bandenmusters in der SDS-PAGE nach Reduktion der Probe aufgefunden. Da bei der Aktivierung der Protease an einer für Serinproteasen typischen Stelle der Primärstruktur eine Spaltung und damit Aktivierung erfolgt, werden bei der Elektrophorese zwei oder mehr Banden sichtbar. Bei Reduktion der über Disulfidbrücken verbundenen Ketten werden die einzelnen Banden entsprechend ihrem niedrigerem Molekulargewicht sichtbar, wobei das Proenzym als große Einzelkette verbleibt. Dies wurde auch in komplexeren Lösungen nach Transfer der Proteine auf Membranen und anschließendes Western Blotting mit geeigneten Antikörpern deutlich.

Aus therapeutischen Gründen besteht nun ein Interesse daran, außer dem Gemisch der beiden genannten Proteine sowohl die Protease in ihrer aktivierten Form als auch das Proenzym zur Verfügung zu haben. Während man die aktivierte Protease zur raschen Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII oder der Einketten-Plasminogenaktivatoren verwenden kann, um akute Krankheitsbilder zu beeinflussen, ist die Proenzymform der Protease vor allem für die mittel- bis längerfristige Prophylaxe oder Behandlung von angeborenen oder erworbenen Mangelzuständen oder auch zur Erhöhung des Plasmaspiegels über das physiologische Maß hinaus als bevorzugtes Mittel zu wählen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die Stabilisierung einer aktivierten Protease schwierig ist, da z. B. eine Eigendegradation stattfinden oder das Molekül aufgrund seiner strukturellen Gegebenheiten instabil sein kann. Bisherige Studien zeigten, dass die den Faktor VII aktivierende Protease nur unter besonderen Umständen in ihrer Proenzymform isoliert und stabilisiert werden kann.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass die biologischen Aktivitäten dieser Protease durch Kalzium und/oder Heparin oder diesem verwandte Substanzen gesteigert werden können. Diese Eigenschaft wurde schon bisher genutzt, um die Protease an immobilisiertes Heparin zu adsorbieren und eine angereicherte Fraktion zu erhalten. Außerdem ist bereits bekannt, dass die Anionenaustauscher-Chromatographie ebenfalls zur Reinigung der Protease geeignet ist. Die Kombination beider Reinigungsschritte ist geeignet, die Protease in angereicherter Form zu gewinnen. Auch die Verwendung einer Aprotinin-Matrix kann zur Reindarstellung der aktivierten Protease verwendet werden.

Es wurde nun ein Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihres Proenzym gefunden, bei dem eines oder mehrere Affinitätschromatographische Trennverfahren und/oder eine fraktionierte Fällung eingesetzt werden.

Als Affinitätschromatographische Trennverfahren können die Adsorption an

- Kalziumphosphat/Hydroxylapatit
- einer hydrophoben Matrix,
- einer Chelatmatrix,
- einer Matrix, auf der Heparin oder eine mit Heparin verwandte Substanz wie Heparansulfat oder Dextransulfat immobilisiert ist und/oder eine Matrix, die mit einem immobilisierten, gegen das zu isolierende Protein gerichteten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder seinen F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmenten beschichtet ist, angewendet werden.

Eine einfache und schnelle Methode zur Anreicherung der Protease und des Proenzym stellt dabei die Adsorption an Kalziumphosphat/Hydroxylapatit dar. Dabei wird die Lösung, die die Protease und das Proenzym enthält, bei einem pH-Wert zwischen 2,5 und 9,0, vorzugsweise zwischen 2,5 und etwa 7,2 mit Kalziumphosphat versetzt. Nach anschließender Sedimentierung, z. B. durch Zentrifugation oder durch Filtration wird das Sediment, ggf. nach ein- oder mehrfachem Resuspendieren in einer Pufferlösung unter Zugabe von bspw. 0,2 M Natriumcitrat eluiert. Die Protease und das Proenzym befinden sich dann im Eluat.

Auch die Adsorption der Protease an hydrophoben Matrices oder an hydrophoben Liganden, die an entsprechende Matrices gekoppelt sind, kann erfindungsgemäß verwendet werden. Beispiele sind Phenyl- oder Octyl-Sepharosen® oder ein an eine Matrix gekoppeltes Phenylalanin. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt in an sich bekannter Weise mit einer gepufferten Lösung geringer Ionenstärke, die Phenylalanin, Glycerin oder Ethylenglykol enthalten kann.

Da die Protease und das Proenzym eine Wechselwirkung mit Kationen, vor allem mit Kalzium und Magnesiumionen eingehen, was durch eine Steigerung ihrer Aktivität in deren Gegenwart bestätigt wird, bietet sich zu deren Anreicherung aus entsprechenden Lösungen die Chromatographie mittels sogenannter "Chelat-Matrices" an. Chelatverbindungen mit Zink-, Kupfer- oder Nickelionen sind dabei besonders geeignet. Nach dem Waschen der mit der Protease beladenen Matrix kann zur Elution gebundener Proteine auch ein Imidazolpuffer, ggf. mit einem linearen Gradienten, eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich auch in der Weise durchführen, dass die genannten Proteine durch fraktionierte Fällung, z. B. durch Zusatz von Polyethylenglykol oder Ammoniumsulfat, aus den sie enthaltenden Flüssigkeiten abgetrennt werden. Derartige fraktionierte Fällungen können als alleiniges Trennverfahren eingesetzt werden, je-

doch wird die Ausbeute und die Wirksamkeit des erfindungsgemässen Verfahrens weiter verbessert, wenn es in beliebiger Kombination und Reihenfolge mit anderen, an sich bekannten Reinigungsverfahren kombiniert wird. So kann man durch Beimischung von Polyethylenglykol (vorzugsweise PEG 6000) ab 10% Endkonzentration zu einer den Faktor VII aktivierenden Protease und das Proenzym enthaltenden Lösung im pH-Bereich von 2,5 bis 9,0 eine Fällung der Protease und des Proenzym durchföhren, ohne dass dabei ein Aktivitätsverlust eintritt. Durch eine hiermit erzielbare fraktionierte PEG-Fällung wird eine Trennung von Verunreinigungen möglich. Dies gilt ebenso für die fraktionierte Fällung mittels Ammoniumsulfat, ab etwa 15% Endkonzentration. Die erhaltenen Protease-Präzipitate lassen sich nicht nur ohne Wirkungsverlust lagern, sie sind insbesondere zur Ankonzentrierung der Protease und des Proenzym geeignet, so dass die Reindarstellung der genannten Proteine in kürzerer Zeit möglich ist und außerdem vermieden wird, dass die Protease aktivierenden Oberflächen ausgesetzt wird, die zu Wirkungsverlusten föhren, wie es z. B. bei der Verwendung von Filtern eintritt.

Im allgemeinen ist es jedoch zweckmäßig, alle Verfahrensschritte zur Isolierung der Protease und des entsprechenden Proenzym aus einer diese Proteine enthaltenden Lösung, wie Plasma, Plasmafraktionen, Gewebeflüssigkeiten oder Zellkulturüberständen der rekombinant oder transgen exprimierten Protease oder deren Mutanten in Gegenwart von Proteinstabilisatoren durchzuföhren. Das Gleiche gilt auch für die Lagerung der genannten Proteine und ihre Anwendung in pharmazeutischen Zubereitungen. Besonders zweckmäßig ist es eine Kombination von mehreren Proteinstabilisatoren anzuwenden, wobei die Proteinstabilisatoren ausgewählt werden sollten aus folgenden Substanzgruppen:

- Komplexbildner zweiwertiger Ionen, vorzugsweise EDTA, EGTA oder Citrat, und/oder
- zweiwertigen Ionen, vorzugsweise Kalziumionen, und/oder
- Aminosäuren, vorzugsweise Glutamat, Arginin, Lysin oder Glyzin, und/oder
- Zucker, vorzugsweise Glukose, Arabinose, Mannose oder Mannit, und/oder
- Lösungsvermittlern, vorzugsweise Hydroxyprolin, und/oder
- Detergentien, vorzugsweise Tween® oder Trion®, und/oder
- Alkoholen, vorzugsweise Ethylenglykol oder Polyethylenglykol, und/oder
- Proteinen, vorzugsweise Albumin, Gelatine, Fibronektin, Vibronektin oder ähnlichen Proteinen, und/oder
- Reduktionsmitteln, vorzugsweise Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein, und/oder
- Proteinase-Inhibitoren wie Aprotinin, α -2-Antiplasmin, C1-Esterase-Inhibitor, dem Inter- α -Trypsin-Inhibitor, dem AntithrombinIII/Heparin oder synthetischen Inhibitoren

Besonders bemerkenswert ist, dass bei den vorstehend beschriebenen Verfahren auch die Proenzymform der Protease in reiner Form erhalten werden kann. Es zeigte sich nämlich, dass unter den genannten sauren Bedingungen aus einer das Proenzym enthaltenden Lösung ein Eluat erhalten werden konnte, das ausschließlich das Proenzym oder wenigstens in sehr stark angereicherten Ausmaß enthielt. Dabei lässt sich die Nativität des so erhaltenen Proenzym mit Hilfe eines der Aktivitätsteste bestimmen, die in der deutschen Patentanmeldung 196 26 531.3 beschrieben sind, also

z. B. durch die photometrische Bestimmung der bei Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion oder durch die nach Reduktion der Probe auftretende Einkettenbildung, die durch SDS-PAGE/Western Blotting nachgewiesen werden kann. Das zeigt, dass erfindungsgemäss die Präparation des Proenzym in schneller und effizienter Weise mit hoher Ausbeute gelingt.

Bei Anwendung der vorstehend genannten Verfahrensschritte kann also sowohl die gereinigte, den Faktor VII aktivierende Protease, ihr Proenzym oder auch ein Gemisch aus der aktivierten Protease und dem Proenzym erhalten werden. Ein besonders empfehlenswerter Weg zur Herstellung einer reinen aktivierten Protease besteht in der chromatographischen Trennung der den Faktor VII aktivierenden Protease von ihrem Proenzym mittels stufenweiser Elution, bei der auf dem Trägermaterial eine Substanz immobilisiert ist, die unterschiedlich starke Bindungen zur Protease einerseits und zum Proenzym andererseits aufweist. Damit können unterschiedliche Eluate gewonnen werden, die entweder nur die aktivierte Protease oder nur das Proenzym enthalten.

Therapeutisch können die genannte aktivierte Protease, das Proenzym oder das Gemisch beider Verbindungen zur Unterstützung der Blutgerinnung bei Blutungsneigung, bei Mangel an Faktoren des endogenen Gerinnungsastes oder als FEIBA (= Factor VIII bypassing activity), aber auch zur endogenen und exogenen Aktivierung von Plasminogenaktivatoren wie der Prourokinase oder des Einketten-tPA verwendet werden. Diese Aktivität kann auch durch Anwendung der genannten Protease zur Prophylaxe oder Therapie von thromboembolischen Erkrankungen in Kombination mit Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren oder Antikoagulantien eingesetzt werden. Krankheitsbilder, die mit thrombotischen Komplikationen vergesellschaftet sind, wie Herzinfarkt, Angina pectoris, Schlaganfall oder Beinvenenthrombosen können so erfolgreich behandelt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine pharmazeutische Zubereitung, die eine zur Auflösung von fibrinhaltenen Thromben ausreichender Menge der dem Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder deren Proenzymform enthält. Auch diese Zubereitung kann außerdem EinkettenPlasminogenaktivatoren und/oder Antikoagulantien enthalten. Zweckmässigerweise wird der Zubereitung noch ein Proteinase-Stabilisator oder ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein zugesetzt, um das Risiko einer Polymerbildung während der Aufarbeitung oder bei der Lagerung zu reduzieren.

Auch bei Wundheilungsprozessen spielen fibrinolytische Prozesse eine Rolle. Dabei kann die genannte Protease und/oder das Proenzym intravenös oder lokal, subkutan, intradermal, intramuskulär oder bei Verletzungen und Wunden als Bestandteil eines Fibrinklebers oder auch topisch oder gebunden an eine geeignete Trägermatrix z. B. in Form eines Vlieses oder eines Pflasters erfolgen, wobei eine Kombination mit Wachstumsfaktoren zweckmässig sein kann. Im allgemeinen kommt eine derartige pharmazeutische Zubereitung in flüssiger oder lyophilisierter Form zur Anwendung, der an sich bekannte Proteinstabilisatoren zugesetzt werden können, also z. B. Komplexbildner, zweiwertige Kationen wie Kalzium, Aminosäuren wie Glutamat, Arginin, Lysin oder Glyzin und/oder Zucker wie Glukose, Arabinose, Mannose oder Mannitol.

Außerdem können die Protease und/oder ihr Proenzym auch zur Beschichtung von in den Organismus zu implantierenden, aus Kunststoffen oder Metallen bestehenden Gegenständen, wie künstlichen Herzklappen, Blutgefässen, aber auch zur Blutentnahme oder künstlichen Ernährung einge-

fürten Kanülen eingesetzt werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

Reindarstellung mittels immobilisierter monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper, die gegen die den Faktor VII aktivierende Protease gerichtet sind, wurden an BrCN-Sepharose® gekoppelt. 30 ml dieser mAb-Matrix wurden in eine Säule gefüllt und das Harz mit 50 mM Natriumcitrat, 0,1 M Natriumchlorid NaCl, 0,1 M Arginin x HCl, pH 6,0, equilibriert.

100 ml Citratplasma wurden über die Säule gepumpt und die Matrix dann mit 50 mM Natriumcitrat, 1 M NaCl, 0,1 M Arginin x HCl, pH 6,0, gewaschen. Danach wurde die Säule mit dem Equilibrierungspuffer erneut gewaschen, woran sich die Elution mit 0,1 M Glyzin, pH 2,5, anschloss. Das Eluat (ca. 30 ml) wurde in einer Vorlage von 3 ml einer 200 mM Natriumcitratlösung, pH 5,5 unter Rühren gesammelt und danach auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt.

Die Eluatlösung wurde zur weiteren Analyse verwendet. Es wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran und eine Detektion der Faktor VII-Aktivator-Bande mit der nicht reduzierten und mit der reduzierten Probe durchgeführt. Aktivitätstests der so gewonnenen Proteine wurden entsprechend dem in der deutschen Patentanmeldung 199 26 531.3 beschriebenen Verfahren, nämlich der Aktivierung von Prourokinase und Faktor VII, mit anschließender Detektion von Urokinase oder dem aktivierten Faktor VII durchgeführt. Die in diesem System getesteten Proteasemengen, bestimmt als Proteaseantigen, entsprechen der erwarteten theoretischen Aktivität, wodurch die Aktivität der isolierten Protease oder des Proenzym hinsichtlich der biologischen Aktivität gezeigt wurde.

Beispiel 2

Anionenaustauscher-Chromatographie

Eine die Proenzymform der Faktor VII-aktivierenden Protease enthaltende Lösung, die noch Verunreinigungen durch andere Proteine enthielt, wurde in einer Pufferlösung aus 20 mM Na-Acetat, 0,1 M Glyzin, pH 4,5, auf eine Mono Q-Sepharose gepumpt und anschließend mit dem o. g. Puffer gewaschen. Die Durchlauf-Fraktion wurde aufgefangen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 20 mM Na-Acetat, 2 M NaCl, pH 4,5. Das Eluat wurde in einen Puffer aus 5 mM Na-Citrat, 50 mM NaCl, pH 6,0, verdünnt und in den in Beispiel 1 genannten Testsystemen untersucht. Aliquots wurden bei 4 bis 8°C gelagert bzw. bei -20°C eingefroren.

Nach Lagerung der Eluatlösung bei 6°C für mehrere Tage wurden die Tests wiederholt, wobei die Verdünnungen der (aufgetauten) Proben jeweils kurz vor dem Test durchgeführt wurden.

SDS-PAGEs/Western Blots bestätigten, dass die Protease in ihrer Proenzymform isoliert worden war. Nach SDS-PAGE und Anfärbung von Proteinen mittels Coomassie Blue waren in der Ausgangslösung (vor Chromatographie) neben der Protease eine Reihe von verunreinigenden Proteinen sichtbar, die ebenfalls in den Durchlauf-Fractionen zu finden waren. Die Protease stellte sich als eine Bande entsprechend der Proenzymform (also auch nach Reduktion) rein dar. Die Aktivitätstests (siehe Beispiel 1) bestätigten die Nativität der Protease im Sinne der Beibehaltung der biologischen Aktivitäten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihres Proenzym durch Anwendung eines oder mehrerer affinitätschromatografischer Trennverfahren und/oder einer fraktionierten Fällung, dadurch gekennzeichnet, dass man als affinitätschromatografisches Trennverfahren die Adsorption an

- Kalziumphosphat/Hydroxylapatit,
- einer hydrophoben Matrix,
- einer Chelatmatrix,
- einer Matrix, auf der Heparin oder eine mit Heparin verwandte Substanz wie Heparansulfat oder Dextransulfat immobilisiert ist und/oder
- einer Matrix, die mit einem immobilisierten, gegen das zu isolierende Protein gerichteten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder seinen F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmenten beschichtet ist, anwendet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eines des chromatografischen Trennverfahren oder die fraktionierte Fällung allein oder jedes der vorstehend genannten Verfahren in beliebiger Kombination mit einem anderen der in Anspruch 1 genannten chromatografischen Trennverfahren anwendet.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass es in Gegenwart von einem oder mehreren Proteinstabilisatoren durchgeführt wird, die ausgewählt werden aus den Gruppen der

- Komplexbildner zweiwertiger Ionen, vorzugsweise EDTA, EGTA oder Citrat, und/oder
- zweiwertigen Ionen, vorzugsweise Kalziumionen, und/oder
- Aminosäuren, vorzugsweise Glutamat, Arginin, Lysin oder Glyzin, und/oder
- Zucker, vorzugsweise Glukose, Arabinose, Mannose oder Mannit, und/oder
- Lösungsvermittlern, vorzugsweise Hydroxyprolin, und/oder
- Detergentien, vorzugsweise Tween® oder Triton®, und/oder
- Alkoholen, vorzugsweise Ethylenglykol oder Polyethylenglykol, und/oder
- Proteinen, vorzugsweise Albumin, Gelatine, Fibronektin, Vibronektin oder ähnlichen Proteinen, und/oder
- Reduktionsmitteln, vorzugsweise Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein, und/oder
- Proteinase-Inhibitoren wie Aprotinin, α -2-Antiplasmin, C1-Esterase-Inhibitor, dem Inter- α -Trypsin-Inhibitor, dem AntithrombinIII/Heparin oder synthetischen Inhibitoren.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur affinitätschromatografischen Trennung der den Faktor VII aktivierenden Protease von ihrem Proenzym mittels stufenweiser Elution auf dem Trägermaterial eine Substanz immobilisiert, die unterschiedliche starke Bindungen zur Protease einerseits und zum Proenzym andererseits aufweist, die unterschiedlichen Eluate dann getrennt voneinander auffängt und aus ihnen das jeweilige Protein isoliert.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die fraktionierte Fällung der Protease und/oder ihres Proenzym aus ihrer Lösung durch Zusatz von

- Polyethylenglykol ab einer Konzentration von mindestens 10 Gew.-% oder

- Ammoniumsulfat ab einer Konzentration von mindestens 15 Gew.-erfolgt.

6. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease und/oder ihr Proenzym zusammen mit einem oder mehreren Protein stabilisatoren gemäß dem Anspruch 3 enthält, zur Unterstützung der Blutgerinnung bei Blutungsneigung, bei Mangel an Faktoren des endogenen Gerinnungsweges, als FEIBA, zur Prophylaxe und/oder Therapie von mit thrombotischen Komplikationen vergesellschafteten Krankheitsbildern, bei angeborenen oder erworbenen Mangelzuständen an der Protease oder ihrem Proenzym, zur Unterstützung der Wundheilung allein oder als Bestandteil eines Fibrinklebers, eines Vlieses und in Kombination mit Wachstumsfaktoren zur subkutanen, intramuskulären, intravenösen oder topischen Behandlung.

7. Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung von Anspruch 6 zur Beschichtung von Oberflächen von in den Organismus zu implantierenden, aus Kunststoff oder Metallen bestehenden Gegenständen, wie künstlichen Herzklappen, Blutgefäßen oder zur Blutentnahme oder zur künstlichen Ernährung eingeführten Kanülen.

8. Reagenz enthaltend die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihr Proenzym zusammen mit einem oder mehreren Protein stabilisatoren gemäß Anspruch 3 zur Verwendung in biologischen Testsystemen und zum Antigennachweis.

30

35

40

45

50

55

60

65

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z012 - Ma 1216 - C45

Process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins by means of affinity chromatography

The invention relates to a process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins, and of pharmaceutical preparations which contain the proteins mentioned individually or as a mixture.

German patent application 19 903 693.4 has already disclosed a protease for the activation of blood clotting factor VII, a process for its production, for its detection and for its inactivation, and pharmaceutical preparations which contain this protease. This protease, first isolated from plasma, occurs there together with a nonactivated form, which is designated below as "proenzyme". The protease activates blood clotting factor VII and accelerates clotting, as was shown by numerous experiments. In the further investigation of the biological properties of this protein, identified as serine protease, it emerged that single-chain plasminogen activators, such as prourokinase, are also effectively activated. Moreover, inactivation of factors V and VIII in vitro was observed. In addition to the sequenced regions already described in German patent application 19 903 693.4, N-terminal sequencings of protease fractions were carried out. The following amino acid sequences characterize the FVII-activating protease: IYGGFKSTAGKHP; LLESLDAPDXTDP; EFHEQSFRVEKI; SKFTXAXPXQFK; where X means not identified. The sequences of the protease mentioned elucidated up to now show that they agree 100% with sequences of the protease published by Choi-Miura (Choi-Miura et al. J. Biochem. 1996; 119: 1157 to 1165).

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z012 - Ma 1216 - C45

Process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins by means of affinity chromatography

The invention relates to a process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins, and of pharmaceutical preparations which contain the proteins mentioned individually or as a mixture.

German patent application 19 903 693.4 has already disclosed a protease for the activation of blood clotting factor VII, a process for its production, for its detection and for its inactivation, and pharmaceutical preparations which contain this protease. This protease, first isolated from plasma, occurs there together with a nonactivated form, which is designated below as "proenzyme". The protease activates blood clotting factor VII and accelerates clotting, as was shown by numerous experiments. In the further investigation of the biological properties of this protein, identified as serine protease, it emerged that single-chain plasminogen activators, such as prourokinase, are also effectively activated. Moreover, inactivation of factors V and VIII in vitro was observed. In addition to the sequenced regions already described in German patent application 19 903 693.4, N-terminal sequencings of protease fractions were carried out. The following amino acid sequences characterize the FVII-activating protease: IYGGFKSTAGKHP; LLESLDPDXTDP; EFHEQSFRVEKI; SKFTXAXPXQFK; where X means not identified. The sequences of the protease mentioned elucidated up to now show that they agree 100% with sequences of the protease published by Choi-Miura (Choi-Miura et al. J. Biochem. 1996; 119: 1157 to 1165).

The investigations until now have especially concentrated on the protease in its activated form. The inactive form of the protease present in the plasma as a proenzyme was only recently discovered by means of a protein band pattern in the SDS-PAGE after reduction of the sample. Since, on the activation of the protease, a cleavage at a site of the primary structure typical for serine proteases and thus activation takes place, two or more bands are visible on electrophoresis. On reduction of the chains which are connected by disulfide bridges, the individual bands become visible in accordance with their lower molecular weight, the proenzyme remaining as a large individual chain. This was also clear in more complex solutions after transfer of the proteins to membranes and subsequent Western blotting using suitable antibodies.

For therapeutic reasons, there is now an interest in having available both the protease in its activated form and the proenzyme, in addition to the mixture of the two proteins mentioned. Whereas the activated protease can be used for the rapid activation of blood clotting factor VII or the single-chain plasminogen activators in order to influence acute syndromes, the proenzyme form of the protease is especially to be chosen as a preferred agent for medium- to longer-term prophylaxis or treatment of inherited or acquired deficiency states or alternatively for increasing the plasma level beyond the physiological extent. However, it is to be taken into account here that the stabilization of an activated protease is difficult, since, for example, self-degradation can take place or the molecule can be unstable on account of its structural conditions. Previous studies showed that the protease activating factor VII can only be isolated and stabilized in its proenzyme form under special circumstances.

The investigations until now have shown that the biological activities of this protease can be increased by calcium and/or heparin or substances related to this. This property has already been previously used in order to adsorb the protease on immobilized heparin and to obtain an enriched fraction. Moreover, it is already known that anion-exchange chromatography is also suitable for the purification of the protease. The combination of both purification steps is suitable

for obtaining the protease in enriched form. An aprotinin matrix can also be used for the preparation in pure form of the activated protease.

A process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme has now been found, in which one or more affinity chromatography separation processes and/or fractional precipitation are employed.

Affinity chromatography separation processes which can be used are adsorption on

- calcium phosphate/hydroxyapatite,
- a hydrophobic matrix,
- a chelate matrix,
- a matrix on which heparin or a substance related to heparin, such as heparan sulfate or dextran sulfate, is immobilized, and/or a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)₂ fragments.

A simple and rapid method for the enrichment of the protease and of the proenzyme is in this case adsorption on calcium phosphate/hydroxyapatite. In the course of this, the solution which contains the protease and the proenzyme is mixed with calcium phosphate at a pH of between 2.5 and 9.0, preferably between 2.5 and approximately 7.2. After subsequent sedimentation, e.g. by centrifugation or by filtration, the sediment, optionally after resuspending one or more times in a buffer solution, is eluted with addition of, for example, 0.2 M sodium citrate. The protease and the proenzyme are then found in the eluate.

The adsorption of the protease on hydrophobic matrices or on hydrophobic ligands which are coupled to appropriate matrices can also be used according to the invention. Examples are phenyl- and octyl-Sepharoses[®] or a phenylalanine coupled to a matrix. The bound protein is eluted in a manner known per se using a buffered solution of low ionic strength, which can contain phenylalanine, glycerol or ethylene glycol.

Since the protease and the proenzyme enter into an interaction with cations, especially with calcium and magnesium ions, which is confirmed by an increase in their activity in the presence thereof, chromatography by means of so-called "chelate matrices" suggests itself for enrichment thereof from corresponding solutions. Chelate compounds with zinc, copper or nickel ions are particularly suitable here. After the washing of the matrix loaded with the protease, an imidazole buffer, if appropriate with a linear gradient, can also be employed for the elution of bound proteins.

The process according to the invention can also be carried out by removing the said proteins by fractional precipitation, e.g. by addition of polyethylene glycol or ammonium sulfate, from the liquids containing them. Fractional precipitations of this type can be employed as the sole separation process, but the yield and the effectiveness of the process according to the invention are further improved if it is combined in any desired sequence with other purification processes known per se. It is thus possible, by admixture of polyethylene glycol (preferably PEG 6000) from 10% final concentration to a solution containing the protease activating factor VII and the proenzyme in the pH range from 2.5 to 9.0, to carry out a precipitation of the protease and of the proenzyme without a loss of activity occurring in the course of this. Owing to fractional PEG precipitation which is achievable thereby, separation of impurities is possible. This also applies to fractional precipitation by means of ammonium sulfate, from approximately 15% final concentration. The protease precipitates obtained can not only be stored without loss of activity, they are particularly suitable for the concentration of the protease and of the proenzyme, so that the preparation in pure form of the

proteins mentioned is possible in a shorter time and, moreover, exposure of the protease to activating surfaces which lead to losses of activity, such as occurs, for example, in the use of filters, is avoided.

In general, however, it is expedient to carry out all process steps for the isolation of the protease and of the corresponding proenzyme from a solution containing these proteins, such as plasma, plasma fractions, tissue fluids or cell culture supernatants of the recombinantly or transgenically expressed protease or mutants thereof in the presence of protein stabilizers. The same also applies to the storage of the proteins mentioned and their use in pharmaceutical preparations. Particularly expediently, a combination of a number of protein stabilizers can be used, where the protein stabilizers should be selected from the following substance groups:

- complexing agents of divalent ions, preferably EDTA, EGTA or citrate, and/or
- divalent ions, preferably calcium ions, and/or
- amino acids, preferably glutamate, arginine, lysine or glycine, and/or
- sugars, preferably glucose, arabinose, mannose or mannitol, and/or
- solubilizers, preferably hydroxyproline, and/or
- detergents, preferably Tween[®] or Triton[®], and/or
- alcohols, preferably ethylene glycol or polyethylene glycol, and/or
- proteins, preferably albumin, gelatin, fibronectin, vitronectin or similar proteins, and/or

- reductants, preferably dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine, and/or
- proteinase inhibitors such as aprotinin, α -2-antiplasmin, C1-esterase inhibitor, the inter- α -trypsin inhibitor, the antithrombin III/heparin inhibitor or synthetic inhibitors.

It is particularly worthy of note that in the processes described above the proenzyme form of the protease can also be obtained in pure form. As a matter of fact, it was seen that it was possible under the said acidic conditions to obtain, from a solution containing the proenzyme, an eluate which contained the proenzyme exclusively or at least to a very greatly enriched extent. In this case, the nativity of the proenzyme thus obtained can be determined with the aid of one of the activity tests which are described in German patent application 196 26 531.3. i.e., for example, by the photometric determination of the extinction occurring in the case of action on chromogenic substrates or by the single-chain formation occurring after reduction of the sample, which can be detected by SDS-PAGE/Western blotting. This shows that according to the invention the preparation of the proenzyme is possible in a rapid and efficient manner and with a high yield.

When using the abovementioned process steps, it is thus possible to obtain both the purified protease activating factor VII, its proenzyme or, alternatively, a mixture of the activated protease and the proenzyme. A route which is particularly worthy of mention for the preparation of a pure activated protease consists in the chromatographic separation of the protease activating factor VII from its proenzyme by means of stepwise elution, in which a substance which has bonds of different strength to the protease on the one hand and to the proenzyme on the other hand is immobilized on the support material. Different eluates can thus be obtained which contain either only the activated protease or only the proenzyme.

Therapeutically, the said activated protease, the proenzyme or the mixture of both compounds can be used to assist blood clotting in the case of a tendency to bleeding, in the case of absence of factors of the endogenous clotting branch or as FEIBA (= factor VIII bypassing activity), but also for the endogenous and exogenous activation of plasminogen activators such as prourokinase or single-chain tPA. This activity can also be employed in combination with single-chain or double-chain plasminogen activators or anticoagulants by use of the said protease for the prophylaxis or therapy of thromboembolic disorders. Syndromes which are associated with thrombotic complications, such as cardiac infarct, angina pectoris, stroke or leg vein thromboses, can thus be successfully treated.

A further subject of the invention is therefore a pharmaceutical preparation which contains an amount of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme form sufficient for the dissolution of fibrin-containing thrombi. This preparation can also moreover contain single-chain plasminogen activators and/or anticoagulants. Expediently, a proteinase stabilizer or a reductant such as dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine is additionally added to the preparation in order to reduce the risk of polymer formation during processing or on storage.

Fibrinolytic processes also play a part in wound-healing processes. In this case, the said protease and/or the proenzyme can be administered intravenously or locally, subcutaneously, intradermally, intramuscularly or, in the case of injuries and wounds, as a constituent of a fibrin adhesive or alternatively topically or bound to a suitable carrier matrix, e.g. in the form of a web or of a patch, where combination with growth factors can be expedient. In general, a pharmaceutical preparation of this type is used in liquid or lyophilized form, to which protein stabilizers known per se can be added, i.e., for example, complexing agents, divalent cations such as calcium, amino acids such as glutamate, arginine, lysine or glycine and/or sugars such as glucose, arabinose, mannose or mannitol.

Moreover, the protease and/or its proenzyme can also be employed for the coating of articles consisting of plastics or metals to be implanted in the body, such as synthetic heart valves, blood vessels, but also cannulas inserted for taking blood or artificial feeding.

The invention is illustrated by the following examples:

Example 1

Preparation in pure form by means of immobilized monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies which are directed against the protease activating factor VII were coupled to BrCN-Sepharose®. 30 ml of this mAb matrix were packed into a column and the resin was equilibrated with 50 mM sodium citrate, 0.1 M sodium chloride (NaCl), 0.1 M arginine × HCl, pH 6.0.

100 ml of citrate plasma were pumped through the column and the matrix was then washed with 50 mM sodium citrate, 1 M NaCl, 0.1 M arginine × HCl, pH 6.0. The column was then washed again with the equilibration buffer, after which elution with 0.1 M glycine, pH 2.5, followed. The eluate (about 30 ml) was collected in a volume of 3 ml of 200 mM sodium citrate solution, pH 5.5, with stirring and then adjusted to a pH of 4.5.

The eluate solution was used for further analysis. An SDS-PAGE with subsequent transfer to a PVDF membrane and detection of the factor VII activator band was carried out using the unreduced and using the reduced sample. Activity tests of the proteins thus obtained were carried out according to the process described in German patent application 199 26 531.3, namely the activation of prourokinase and factor VII, with subsequent detection of urokinase or activated factor VII. The amounts of protease tested in this system, determined as protease antigen, correspond to the expected theoretical activity, whereby the activity of the isolated protease or of the proenzyme with respect to the biological activity was shown.

Example 2

Anion-exchange chromatography

A solution containing the proenzyme form of the factor VII-activating protease and which still contained contaminations by other proteins was pumped onto Mono Q Sepharose in a buffer solution of 20 mM Na acetate, 0.1 M glycine, pH 4.5 and then washed with the abovementioned buffer. The fraction passing through was collected. Bound proteins were eluted using 20 mM Na acetate, 2 M NaCl, pH 4.5. The eluate was diluted in a buffer of 5 mM Na citrate, 50 mM NaCl, pH 6.0, and investigated in the test systems mentioned in Example 1. Aliquots were stored at 4 to 8°C or frozen at -20°C.

After storage of the eluate solution at 6°C for several days, the tests were repeated, the dilutions of the (thawed) samples in each case being carried out shortly before the test.

SDS-PAGEs/Western blots confirmed that the protease had been isolated in its proenzyme form. After SDS-PAGE and staining of proteins by means of Coomassie Blue, in addition to the protease a number of contaminating proteins, which were also to be found in the fractions passing through, were visible in the starting solution (before chromatography). The protease was represented as a band corresponding to the proenzyme form (i.e. even after reduction) in pure form. The activity tests (see Example 1) confirmed the nativity of the protease in the sense of the retention of the biological activities.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z012 - Ma 1216 - C45

Patent Claims:

1. A process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme by use of one or more affinity chromatography separation processes and/or fractional precipitation, **which comprises** using, as the affinity chromatography separation process, adsorption on
 - calcium phosphate/hydroxyapatite,
 - a hydrophobic matrix,
 - a chelate matrix,
 - a matrix on which heparin or a substance related to heparin, such as heparan sulfate or dextran sulfate, is immobilized, and/or
 - a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)₂ fragments.
2. The process as claimed in claim 1, **wherein** one of the chromatographic separation processes or fractional precipitation on its own or each of the abovementioned processes is used in any desired combination with another of the chromatographic separation processes mentioned in claim 1.

3. The process as claimed in claims 1 and 2, which is carried out in the presence of one or more protein stabilizers which are selected from the groups consisting of
 - complexing agents of divalent ions, preferably EDTA, EGTA or citrate, and/or
 - divalent ions, preferably calcium ions, and/or
 - amino acids, preferably glutamate, arginine, lysine or glycine, and/or
 - sugars, preferably glucose, arabinose, mannose or mannitol, and/or
 - solubilizers, preferably hydroxyproline, and/or
 - detergents, preferably Tween® or Triton®, and/or
 - alcohols, preferably ethylene glycol or polyethylene glycol, and/or
 - proteins, preferably albumin, gelatin, fibronectin, vitronectin or similar proteins, and/or
 - reductants, preferably dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine, and/or
 - proteinase inhibitors such as aprotinin, α -2-antiplasmin, C1-esterase inhibitor, the inter- α -trypsin inhibitor, the antithrombin III/heparin inhibitor or synthetic inhibitors.
4. The process as claimed in claims 1 to 3, **wherein**, for the affinity chromatography separation of the protease activating factor VII from its proenzyme by means of stepwise elution, a substance which has bonds

of different strength to the protease on the one hand and to the proenzyme on the other hand is immobilized on the support material, the different eluates are then collected separately from one another and the respective protein is isolated from them.

5. The process as claimed in claims 1 to 4, **wherein** the fractional precipitation of the protease and/or its proenzyme from its solution is carried out by addition of
 - polyethylene glycol from a concentration of at least 10% by weight or
 - ammonium sulfate from a concentration of at least 15% by weight.
6. A pharmaceutical preparation, **which comprises** the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme together with one or more protein stabilizers as set forth in claim 3, for assisting blood clotting in the case of a tendency to bleeding, in the case of a lack of factors of the endogenous clotting pathway, as FEIBA or for the prophylaxis and/or therapy of syndromes associated with thrombotic complications, in inherited or acquired deficiency states of the protease or its proenzyme, for assisting wound healing alone or as a constituent of a fibrin adhesive, a web and in combination with growth factors for subcutaneous, intramuscular, intravenous or topical treatment.
7. The use of a pharmaceutical preparation of claim 6 for the coating of surfaces of articles consisting of plastic or metals to be implanted in the body, such as synthetic heart valves, blood vessels or cannulas inserted for taking blood or for artificial feeding.
8. A reagent comprising the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme together with one or more protein stabilizers as set forth in claim 3 for use in biological test systems and for antigen detection.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z012 - Ma 1216 - C45

Abstract

Process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins by means of affinity chromatography

A process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme by use of one or more affinity chromatography separation processes and/or fractional precipitation is described, in which the affinity chromatography separation process used is adsorption on

- calcium phosphate/hydroxyapatite,
- a hydrophobic matrix,
- a chelate matrix,
- a matrix on which heparin or a substance related to heparin, such as heparan sulfate or dextran sulfate, is immobilized, and/or
- a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)₂ fragments.

A pharmaceutical preparation and a reagent are moreover described which contain the said protease and its proenzyme.